

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 289**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4743** (2006.01)

**C07D 471/02** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07814797 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2091536**

54 Título: **Compuestos enantioméricos con actividad antibacteriana**

30 Prioridad:

**26.09.2006 US 826940 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.11.2013**

73 Titular/es:

**CRESTONE, INC. (100.0%)  
6973 CARTER TRAIL  
BOULDER, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**GUILES, JOSEPH;  
SUN, XICHENG;  
JANJIC, NEBOJSA;  
STRONG, SARAH y  
GYORKOS, ALBERT CHARLES**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 429 289 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos enantioméricos con actividad antibacteriana

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevos enantiómeros de compuestos heteroaromáticos bicíclicos que inhiben metionil ARNt sintetasa bacterianas (MetRS) y a procedimientos para su preparación y su uso en terapia como agentes antibacterianos. Además, la presente invención se refiere al uso de estos compuestos enantioméricos en el tratamiento de infecciones y enfermedades basadas en *Clostridium difficile*.

### Antecedentes de la invención

10 La búsqueda de agentes antibacterianos se inició a finales del siglo XIX con la idea de que los "gérmenes" causaban enfermedades humanas. Durante el siglo pasado, los científicos han desarrollado diversos fármacos útiles en la dirección y en la inhibición de numerosas cepas bacterianas. En particular, se desarrollaron agentes antibacterianos conocidos como antibióticos y son de uso común en todo el mundo industrializado para tratar la mayoría de las infecciones bacterianas conocidas. Originalmente, los antibióticos como la penicilina inhibían la replicación de bacterias mediante el bloqueo de la acción de la transpeptidasa, una enzima responsable de la construcción de las paredes celulares bacterianas. Sin embargo, debido al uso excesivo y a las adaptaciones de resistencia de muchas cepas bacterianas, muchos antibióticos han perdido parte o la totalidad de su eficacia en el tratamiento de la infección. Resultaría útil una línea de agentes antibacterianos que tengan como diana nuevos mecanismos de crecimiento molecular para evitar un aumento adicional de resistencia a antibióticos. Una de dichas dianas es la ARNt sintetasa.

20 Las ARNt sintetasa están implicadas en la biosíntesis de proteínas de modo que se puede esperar que la inhibición de las mismas conduzca a una detención del crecimiento celular. Por lo tanto, por ejemplo, se ha mostrado que el compuesto mupirocina es un inhibidor de la isoleucil ARNt sintetasa. La mupirocina es producida por el organismo *Pseudomonas fluorescens*, y es un agente antibacteriano usado como el principio activo en el producto Bactroban®, comercializado por GlaxoSmithKline. Cada ARNt sintetasa representa una diana distinta para el descubrimiento de fármacos. Los inhibidores de ARNt sintetasa que son selectivos para células bacterianas más que para células de mamífero son de interés terapéutico considerable ya que tienen el potencial de usarse como agentes antibacterianos.

30 Recientemente se ha determinado la secuencia de los genes de ARNt sintetasa en el organismo Gram positivo *S. aureus* (véase, por ejemplo, la solicitud de Patente Europea N° 97300317,1, SmithKline Beecham, para MetRS de *S. aureus*), facilitando de este modo el procedimiento de identificación de inhibidores. Además, también se ha publicado la secuencia de los genes de ARNt sintetasa en otras bacterias patógenas, por ejemplo el organismo Gram negativo *H. influenzae* (R.D. Fleischmann y col., Science, 269, 496-512, 1995).

35 Recientemente se han desvelado varios compuestos por su actividad inhibidora hacia MetRS y por su capacidad como agentes antibacterianos. Por ejemplo, el documento WO 00/219 49 describe diversos compuestos de quinolona 2-(sustituidos con NH- u O-), que son inhibidores de la metionil ARN-t sintetasa. En particular, Jarvest y col. describieron diversos compuestos heteroaromáticos bicíclicos que han mostrado cierto grado de inhibición de MetRS que incluye un compuesto en particular que es el enantiómero con la configuración R de un compuesto de tetrahydroquinolina en el lado izquierdo (Bioorg. & Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3937-3941).

40 Una diana bacteriana particularmente interesante es el organismo *Clostridium difficile* (*C. difficile*). *C. difficile* se está convirtiendo en un agente infeccioso cada vez más frecuente, siendo de un uno a un tres por ciento de los individuos sanos portadores del organismo. (Bartlett y Perl, N. Engl. J Med., 353, 2503-2505, 2005; Clabots y col., J Infect. Dis., 166, 561-567, 1992; McFarland y col., N. Engl. J Med., 320, 204-210, 1989). El riesgo de infección y de enfermedad se vuelven cada vez más frecuentes en personas mayores, inmunodeficientes, y especialmente, en las personas mayores en centros asistenciales, por ejemplo, residencias de ancianos, hospitales, consultorio médico, etc. Pocos fármacos antibacterianos convencionales han mostrado ser prometedores en el tratamiento de *C. difficile*, de hecho sólo la vancomicina está aprobada por la FDA para el tratamiento de la diarrea asociada a *C. difficile* (DACD). Como tal, existe una necesidad en la técnica para obtener enfoques adicionales para el tratamiento de la infección por *C. difficile*, especialmente tratamientos que eviten los tratamientos antibióticos convencionales y por lo tanto la resistencia a antibióticos.

50 La presente invención se ha descubierto en este contexto.

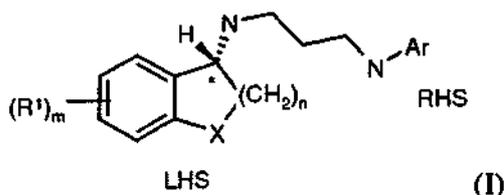
### Descripción detallada de la invención

55 La invención proporciona compuestos nuevos que son inhibidores potentes de la metionil ARNt sintetasa bacteriana (MetRS). Se muestra que los compuestos de la invención tienen amplia aplicabilidad como agentes antibacterianos para numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los inhibidores de MetRS tienen la mejor actividad frente a organismos Gram-positivos y una actividad mucho más débil frente a organismos Gram-negativos. En particular, se muestra que los compuestos de la invención tienen actividad antibacteriana sorprendentemente

potente frente a *C. difficile*.

Los compuestos de la invención son nuevos enantiómeros heteroaromáticos bicíclicos que muestran una inhibición inesperada y potente de MetRS bacteriana. Estos compuestos muestran poca o ninguna inhibición de MetRS de mamífero. Los compuestos de la invención son para uso en terapia como agentes antibacterianos. En particular, los compuestos de la invención han mostrado potencia sorprendentemente fuerte frente a bacterias Gram-positivas y en particular frente a *C. difficile*.

En el presente documento se describen compuestos de fórmula (I):



en la que:

Ar es el sustituyente en el lado derecho (RHS) y tiene un grupo arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, SO<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>;

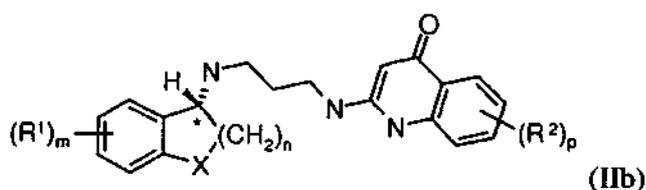
n es 1, 2 o 3;

\* indica un átomo de carbono asimétrico, en el que cuando n es 2 o 3, entonces \* es la configuración R; en la que cuando n es 1 y X es CH<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración R; y en la que cuando n es 1 y X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, o SO<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración S.

m es 0, 1, 2, 3 o 4; y

R<sup>1</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquilo (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>) y heterocíclico.

En el presente documento también se describen los compuestos de fórmula (IIb):



en la que:

X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, SO<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>;

n es 1, 2 o 3;

\* indica un átomo de carbono asimétrico, en el que cuando n es 2 o 3, entonces \* es la configuración R; en el que cuando n es 1 y X es CH<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración R; y en el que cuando n es 1 y X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, o SO<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración S;

R<sup>1</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquilo (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>) y heterocíclico;

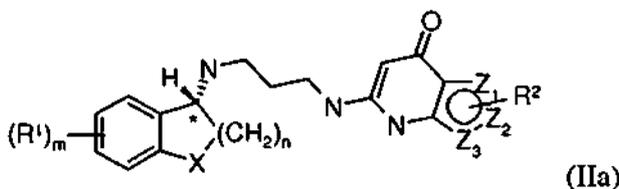
m es 0, 1, 2, 3 o 4;

p es 0, 1, 2 o 3;

R<sup>2</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquiloxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>) y heterocíclico.

5

Una realización de la presente invención es un compuesto de fórmula (IIa):



en la que:

X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, SO<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>;

10 n es 1, 2 o 3;

\* indica un átomo de carbono asimétrico, en el que cuando n es 2 o 3, entonces \* es la configuración R; en el que cuando n es 1 y X es CH<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración R; y en el que cuando n es 1 y X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, o SO<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración S;

15 R<sup>1</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquiloxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>) y heterocíclico;

m es 0, 1, 2, 3 o 4;

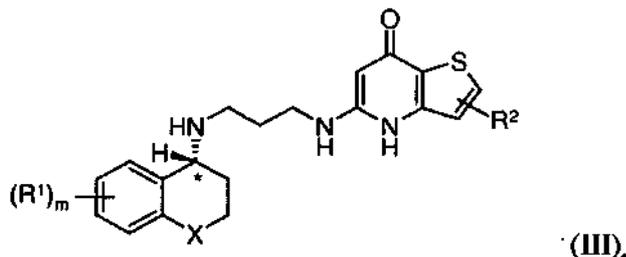
20 R<sup>2</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquiloxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>) y heterocíclico; y

25 cuando Z<sub>1</sub> es S, Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> son CH; cuando Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>1</sub> y Z<sub>3</sub> son CH; y cuando Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> son CH.

Los compuestos de fórmula (IIa) y (IIb) son no racémicos quirales y se pueden aislar en exceso enantiomérico elevado en sus configuraciones R o S. Los compuestos de fórmula (II) comprenden compuestos de la fórmula que tienen al menos un 60 % de exceso enantiomérico del enantiómero R o del enantiómero S, y pueden ser enantioméricamente puros, en los que básicamente un 100 % del compuesto es un único enantiómero (tal como se mide por rotación óptica, HPLC quiral, o tal como se mide en una base de peso/peso). Los compuestos enantiómeros preferentes tienen una configuración R o una configuración S.

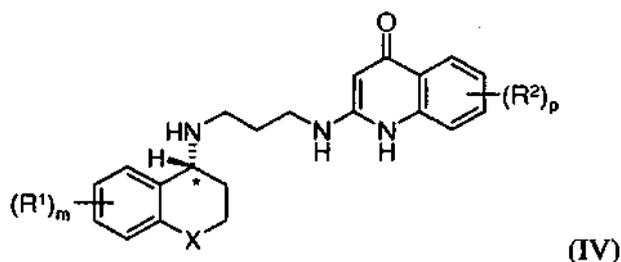
30

Un grupo preferente de compuestos de fórmula (IIa) son aquéllos en los que el lado izquierdo (LHS) de la fórmula es tal como se muestra en la fórmula (III) y el lado derecho (RHS) de la fórmula (o Ar) es un grupo tienopiridona (fórmula III), en la que X se define como en la Fórmula (IIa):



35

Además se describen compuestos de fórmula (IIb) en la que el LHS de la fórmula es tal como se muestra en la Fórmula (IV) y el RHS de la fórmula es un grupo quinolona (fórmula IV):



en la que:

X se define como en las Fórmulas (IIa) y (IIb).

5 En la fórmula (III) y en la fórmula (IV),  $R^1$  se define como en las Fórmulas (IIa) y (IIb).  $(R^1)_m$  se puede definir adicionalmente como una sustitución en la posición 6, 8 en el anillo en la que pueden ser los mismos o diferentes sustituyentes, y preferentemente bromo, cloro, yodo o sulfano;

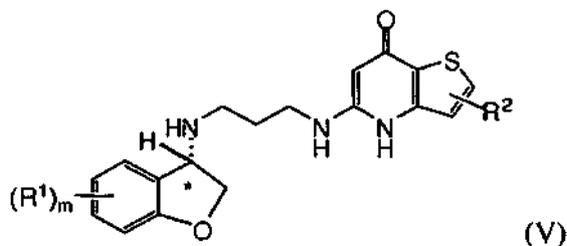
m se define como en las Fórmulas (IIa) y (IIb);

$R^2$  se define como en las Fórmulas (IIa) y (IIb); y

p se define como en las Fórmulas (IIa) y (IIb).

10 Como anteriormente, las fórmulas (III) y (IV) están caracterizadas por un átomo de carbono asimétrico marcado con un asterisco (\*). Los enlaces que rodean a este carbono dan origen a una configuración R en los compuestos de fórmula (III) o (IV). Los compuestos de fórmula (III) o (IV) generalmente son no racémicos quirales y se pueden aislar con alto exceso enantiomérico del enantiómero R. Los compuestos de fórmula (III) o (IV) comprenden compuestos de la respectiva fórmula que tienen al menos un 60 % de enantiómero R y pueden ser enantioméricamente puros en  
 15 los que básicamente un 100 % del compuesto está en la configuración R (tal como se mide por rotación óptica, HPLC quiral, o peso). Los compuestos preferentes que tienen la fórmula (III) o (IV) están en la configuración R.

Otro grupo preferente de compuestos de fórmula (IIa) son aquéllos en los que el LHS de la fórmula es un grupo dihidrobenzofurano y el RHS de la fórmula es un grupo tienopiridona (fórmula V):



20 en la que:

$R^1$  se define como en la fórmula (IIa). En realizaciones más preferentes,  $(R^1)_m$  se puede definir adicionalmente como una sustitución en la posición 5, 7 en el anillo en la que pueden ser los mismos o diferentes sustituyentes, y preferentemente bromo, cloro, yodo o sulfano;

m se define como en la Fórmula (IIa);

25  $R^2$  se define como en la Fórmula (IIa);

Como anteriormente, la fórmula (V) está caracterizada por un átomo de carbono asimétrico marcado con un asterisco (\*). Los enlaces que rodean a este carbono dan origen a una configuración S. Los compuestos de fórmula (V) generalmente son no racémicos quirales y se pueden aislar con un alto exceso enantiomérico en el enantiómero S. En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (V) tienen al menos un 60 % de enantiómero S y pueden ser  
 30 enantioméricamente puros en los que básicamente un 100 % del compuesto está en la configuración S (tal como se mide por rotación óptica o peso). En realizaciones preferentes, los compuestos que tienen la fórmula (V) están en la configuración S.

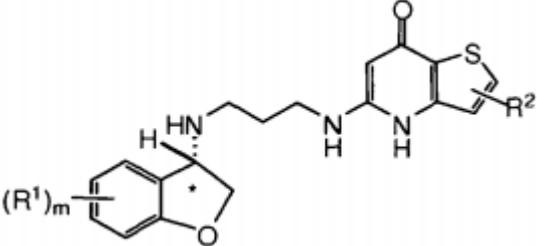
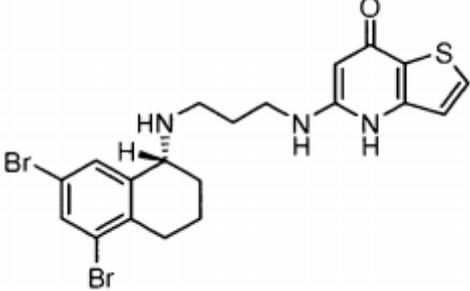
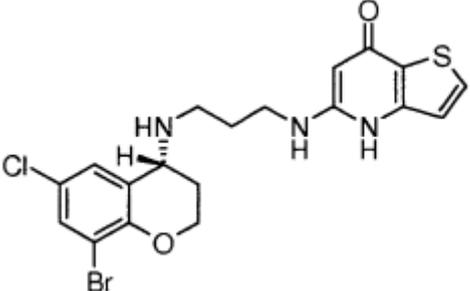
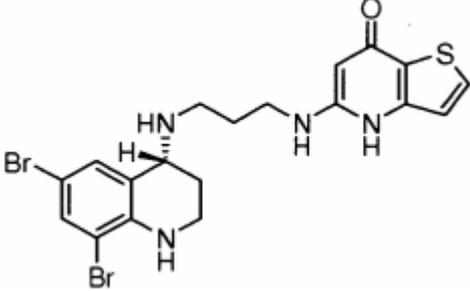
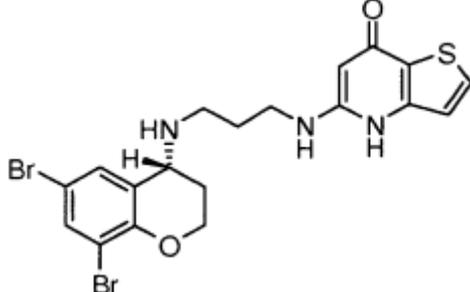
En el presente documento se describen compuestos de los ejemplos 1-12. En particular, los compuestos preferentes de la invención incluyen los compuestos de fórmulas (IV), (VII), (VIII), (IX), y (XI) (mostrados a continuación y véase  
 35 la Tabla 1):

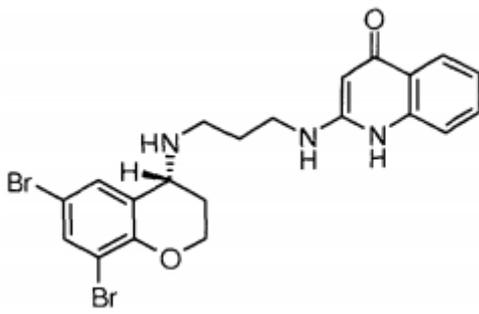
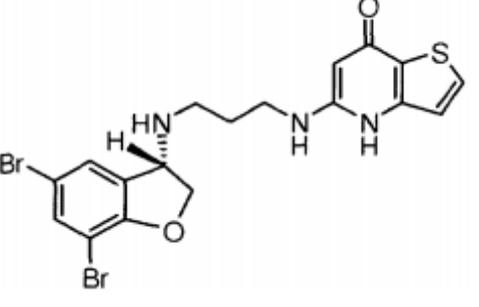
- 5- $[3-((R)(-)-5,7\text{-Dibromo-}1,2,3,4\text{-tetrahidro-naftalen-}1\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}4\text{H-tieno}[3,2\text{-}6b]\text{piridin-}7\text{-ona}$  (fórmula VI);  
 5- $[3-((R)(+)-8\text{-Bromo-}6\text{-cloro-croman-}4\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}4\text{H-tieno}[3,2\text{-}b]\text{piridin-}7\text{-ona}$  (fórmula VII);  
 5- $[3-((R)(+)-6,8\text{-Dibromo-}1,2,3,4\text{-tetrahidro-quinolin-}4\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}4\text{H-tieno}[3,2\text{-}b]\text{piridin-}7\text{-ona}$  (fórmula VIII);  
 5- $[3-((R)(+)-6,8\text{-Dibromo-croman-}4\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}4\text{H-tieno}[3,2\text{-}b]\text{piridin-}7\text{-ona}$  (fórmula IX);  
 5- $[3-((S)-5,7\text{-Dibromo-}2,3\text{-dihidrobenzofuran-}3\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}4\text{H-tieno}[3,2\text{-}b]\text{piridin-}7\text{-ona}$  (fórmula XI).

En el presente documento también se describe el compuesto 2- $[3-((R)(+)-6,8\text{-Dibromo-croman-}4\text{-ilamino})\text{-propilamino}]\text{-}1\text{H-quinolin-}4\text{-ona}$  (Fórmula X).

- 10 La Tabla 1 proporciona un resumen de los compuestos que se describen en el presente documento, mostrando la funcionalidad del LHS (lado izquierdo) y del RHS (lado derecho); los compuestos de fórmula (IIa), fórmula (III) y fórmula (V) son compuestos de la invención tal como se reivindica:

Nº DE FORMA/ Nº DE EJ.	ESTRUCTURA	LHS (sustituido o sin sustituir)	RHS (sustituido o sin sustituir)
(I)		Véase estructura	Arilo o heteroarilo
(IIa)		Cromano, Tetrahidroquinolina, Dihidrobenzofurano, Tetrahidronaftaleno, o Benzotiopirano	Tienopiridona
(IIb)		Cromano, Tetrahidroquinolina, Dihidrobenzofurano, Tetrahidronaftaleno, o Benzotiopirano	Quinolona
(III)		Cromano, Tetrahidroquinolina, Benzotiopirano, Tetrahidronaftaleno	Tienopiridona o
(IV)		Cromano, Tetrahidroquinolina, Benzotiopirano, Tetrahidronaftaleno	Quinolona o

(V)		Dihidrobencofurano	Tienopiridona
(VI) [Ej. 10]		5-[3-((R)(-)-5,7-Dibromo-1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona	
(VII) [Ej. 4]		5-[3-((R)(+)-8-Bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona	
(VIII) [Ej. 8]		5-[3-((R)(+)-6,8-Dibromo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno [3,2-b]piridin-7-ona	
(IX) [Ej. 2]		5-[3-((R)(+)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona	

(X) [Ej. 6]		2-[3-((R)(+)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-1H-quinolin-4-ona
(XI) [Ej. 11]		5-[3-((S)-5,7-Dibromo-2,3-dihydrobenzofuran-3-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

Las sales se pueden formar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos y orgánicos adecuados a partir de los que se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas (I-XI) incluyen los ácidos: maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, bismetileno-salicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, acético, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

Cuando se usa en el presente documento, el término "alquilo" y términos similares tales como "alcoxi" incluye todos los isómeros de cadena lineal y ramificados. Los ejemplos representativos de los mismos incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo y *n*-hexilo.

Cuando se usan en el presente documento, los términos "alqueno" y "alquino" incluyen todos los isómeros de cadena lineal y ramificados. Los ejemplos representativos de los mismos incluyen vinilo, etinilo y 1-propinilo.

Los sustituyentes preferentes para los grupos alquilo y alqueno incluyen, por ejemplo, y a menos que se indique lo contrario, halógeno, ciano, azido, nitro, carboxi, alcocarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- o dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>), sulfuro, sulfamoilo, mono- o dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, ureido, alcocarbonilamino (C<sub>1-6</sub>), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino, arilo, heterocíclico, hidroxilo, alcoxi (C<sub>1-6</sub>), aciloxi, oxo, acilo, 2-tienoilo, alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfino (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), hidroximino, alcóximino (C<sub>1-6</sub>), hidrazino, hidrazono, benzohidroximilo, guanidino, amidino y iminoalquilamino.

Cuando se usa en el presente documento, el término "arilo" incluye, a menos que se indique lo contrario, fenilo o naftilo opcionalmente sustituido con hasta cinco, preferentemente hasta tres, sustituyentes.

Cuando está sustituido, un grupo arilo puede tener hasta cuatro sustituyentes. Los sustituyentes preferentes para un grupo arilo incluyen, por ejemplo, y a menos que se indique lo contrario, halógeno, ciano, alquilo (C<sub>1-6</sub>), mono a perfluoroalquilo (C<sub>1-3</sub>), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alqueno (C<sub>2-6</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), alquenoxi (C<sub>2-6</sub>), arilalcoxi (C<sub>1-6</sub>), haloalquilo (C<sub>1-6</sub>), hidroxilo, amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, nitro, carboxi, alcocarbonilo (C<sub>1-6</sub>), alquenoiloxycarbonilo (C<sub>1-6</sub>), alcocarbonil (C<sub>1-6</sub>) alquilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquilo (C<sub>1-6</sub>), alquilcarboniloxi (C<sub>1-6</sub>), carboxialquilo (C<sub>1-6</sub>), alcocarbonil (C<sub>1-6</sub>)alcoxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfino (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C<sub>1-6</sub>), y heterocíclico.

Cuando se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" incluye anillos únicos o condensados que comprenden hasta cuatro heteroátomos en el anillo seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. El anillo heteroarilo comprende preferentemente de 4 a 7, preferentemente de 5 a 6, átomos en el anillo. Un sistema de anillo de heteroarilo condensado puede incluir anillos carbocíclicos y necesita incluir sólo un anillo heterocíclico.

Cuando se usa en el presente documento, el término "heterocíclico" incluye anillos únicos o condensados aromáticos y no aromáticos que comprenden hasta cuatro heteroátomos en el anillo seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Convenientemente, el anillo heterocíclico comprende de 4 a 7, preferentemente de 5 a 6, átomos en el anillo. Un sistema de anillo heterocíclico condensado puede incluir anillos carbocíclicos y necesita incluir sólo un anillo heterocíclico.

Cuando está sustituido, un grupo heteroarilo o heterocíclico puede tener hasta tres sustituyentes. Los sustituyentes preferentes incluyen los que se han mencionado anteriormente para un grupo arilo así como oxo.

Cuando se usan en el presente documento, los términos "halógeno" y "halo" incluyen flúor, cloro, bromo, y yodo y fluoro, cloro, bromo, y yodo, respectivamente.

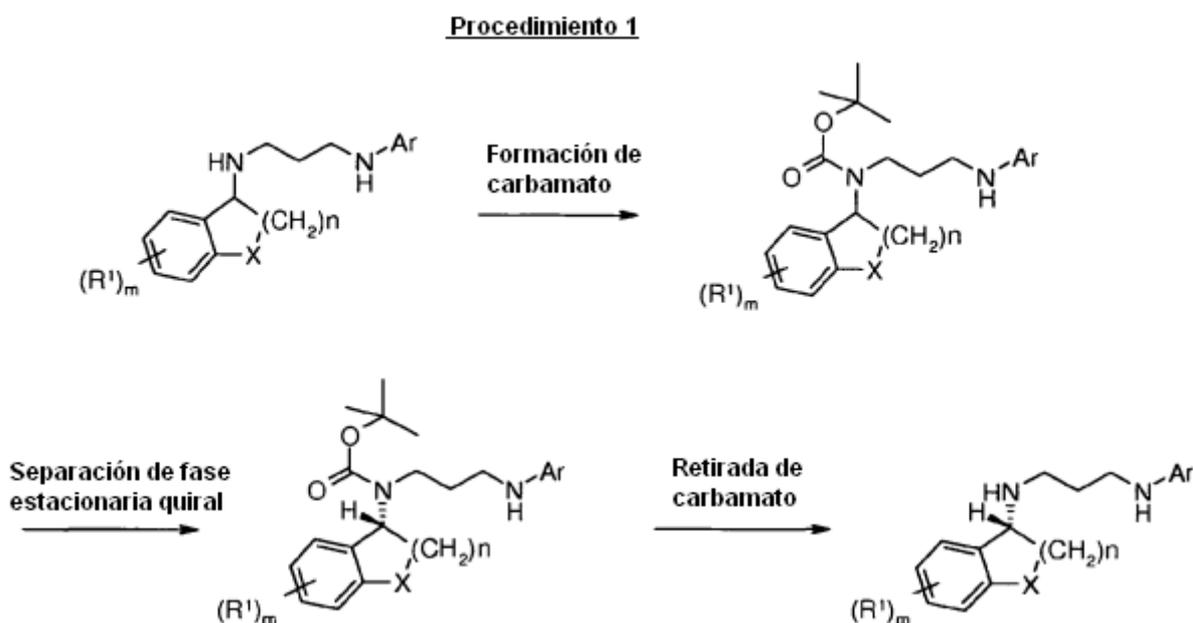
5 Cuando se usa en el presente documento, el término "enantiómero" se refiere a uno de los dos compuestos que difieren en la quiralidad y se dice que tienen una relación enantiomérica. Para convertir un enantiómero en el otro enantiómero es necesario romper y volver a formar enlaces o distorsionar la molécula a través de la geometría plana. Se dice que un enantiómero está en exceso enantiomérico cuando una configuración del enantiómero está presente en exceso sobre la otra configuración del enantiómero. El exceso enantiomérico se puede medir sobre la base de peso/peso o por la rotación óptica neta de la mezcla.

10 Cuando se usan en el presente documento, los términos "(R)" o "R" y "(S)" o "S" se basan en las convenciones de nomenclatura bien conocidas por el experto en la materia dentro de la técnica, por ejemplo, una configuración R se basa en una geometría real de un compuesto, que usa generalmente las reglas de prioridad de Cahn-Ingold-Prelog para clasificar la forma (Smith M.B., March, J, March's Advanced Organic Chemistry, 5ª ed. Wiley-Interscience, Nueva York, 2001, páginas 139-141). Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los compuestos de la invención se han caracterizado por tener configuración R o una configuración S.

15 Los compuestos de acuerdo con la invención se proporcionan adecuadamente en forma básicamente pura, por ejemplo al menos pura en un 50 %, adecuadamente al menos pura en un 60 %, ventajosamente al menos pura en un 75 %, preferentemente al menos pura en un 85 %, más preferentemente al menos pura en un 95 %, especialmente al menos pura en un 98 %, siendo calculados todos los porcentajes como peso/peso. Todas las formas impuras o menos puras de un compuesto de acuerdo con la invención se pueden usar, por ejemplo, en la preparación de una forma más pura del mismo compuesto o de un compuesto relacionado (por ejemplo un derivado correspondiente) adecuado para uso farmacéutico.

20 Los compuestos de fórmulas (I)-(XI) se pueden preparar mediante procedimientos que se describen en el presente documento o mediante procedimientos que se describen en la técnica anterior que se detallan a continuación.

En una realización, un compuesto enantioméricamente enriquecido de la presente invención se puede preparar por separación quiral tal como se representa en el procedimiento 1.

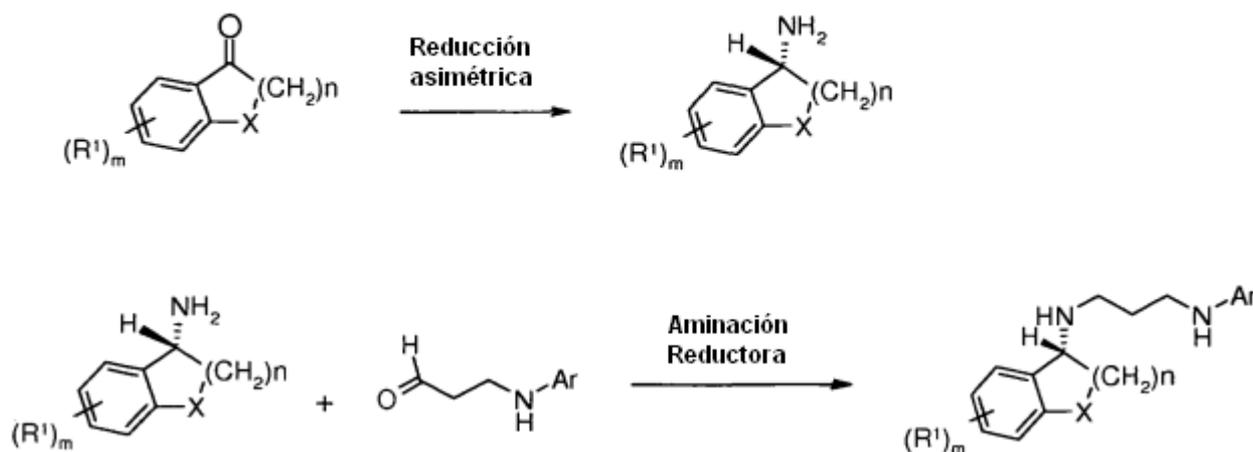


30 Los compuestos deseados se prepararon como mezclas racémicas de acuerdo con procedimientos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con Número de Serie 11/853.314, titulada "Compuestos de Tienopiridona Sustituida con Actividad Antibacteriana", presentada el 11 de Septiembre de 2007. Los racematos se separaron a continuación mediante cromatografía quiral en fase estacionaria. Los racematos se convirtieron a una funcionalidad carbamato tal como  $t$ -butoxicarbonilo (Boc) como un medio para facilitar la separación quiral. La mezcla racémica de los compuestos se protegió con Boc en condiciones conocidas con hidruro sódico y Boc-anhídrido en THF (Formación de carbamato en el procedimiento 1). Las mezclas racémicas protegidas con Boc se separaron a continuación en los enantiómeros individuales mediante cromatografía quiral preparativa (HPLC prep) y se aislaron

los enantiómeros (véase Separación quiral en el procedimiento 1). Los enantiómeros separados se desprotegen a continuación (véase Retirada de carbamato en el procedimiento 1) para dar los compuestos finales en la forma muy enriquecida enantioméricamente.

- 5 En una realización, un compuesto enantioméricamente enriquecido de la presente invención se puede preparar mediante síntesis catalítica asimétrica tal como se representa en el procedimiento II.

### Procedimiento II



- 10 Los compuestos deseados se prepararon como formas enantioméricamente enriquecidas mediante una hidrogenación de transferencia asimétrica catalítica de una cetona a un alcohol seguido de la conversión en la amina mediante una azida intermedia. La aminación reductora y la retirada del grupo protector dieron los compuestos finales.

- 15 Los compuestos de la presente invención son activos frente a diversas bacterias patógenas importantes, que incluyen organismos Gram positivos, tales como *Estafilococos*, por ejemplo cepas de *S. aureus* Oxford y coagulasa negativas de *Estafilococos* tales como *S. epidermidis*; *Streptococos*, por ejemplo *S. pyogenes* ATCC19615 y *S. pneumoniae* R6; *Clostridium*, por ejemplo *C. difficile*, y *Enterococos*, por ejemplo *E. faecalis* 1 y *E. faecium*. Preferentemente, los compuestos de la presente invención también son activos frente a organismos Gram negativos, tales como *Haemophilus*, por ejemplo *H. influenzae* Q1; *Moraxella*, por ejemplo *M. catarrhalis* 1502; *Helicobacter*, por ejemplo *H. pylori* ATCC700824; y *Escherichia*, por ejemplo *E. Coli* DC0. Los compuestos más preferentes de la presente invención serán activos frente a los organismos *C. difficile*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *H. influenzae*, *H. pylori*, y *M. catarrhalis*.

- 20 Además, los compuestos de la presente invención son activos frente a organismos *Estafilococos* tales como *S. aureus* y cepas coagulasa negativas de *Estafilococos* tales como *S. epidermidis* que son resistentes (incluyendo la resistencia múltiple) a otros agentes antibacterianos, por ejemplo, antibióticos de  $\beta$ -lactamas tales como, por ejemplo, meticilina, macrólidos, aminoglicósidos, oxazolidinonas, y lincosamidas.

- 25 Los compuestos de la presente invención también son eficaces frente a cepas de *E. faecalis* que incluyen cepas resistentes a vancomicina y por lo tanto de uso en el tratamiento de infecciones asociadas con organismos VRE. Además, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de organismos *Estafilococos* que son resistentes a mupirocina.

- 30 Los compuestos de la presente invención son particularmente potentes, es decir, tienen actividad frente a *Clostridium* incluyendo *Clostridium difficile*. Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden usar para tratar infecciones asociadas con *C. difficile*, por ejemplo, colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico, y otras diarreas asociadas a antibióticos (DAA).

Los compuestos de la presente invención sin embargo, no son activos frente a células de mamíferos. Esto proporciona una combinación óptima de alta actividad frente a bacterias patógenas y baja o ninguna actividad frente a células de mamíferos, lo que permite el uso de estos compuestos en tratamientos de mamíferos.

- 35 Las infecciones bacterianas que se pueden tratar incluyen infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones del tracto respiratorio, otitis media, meningitis, endocarditis, infecciones de la piel y de tejidos blandos en el ser humano, mastitis en el ganado, y también infecciones respiratorias en animales de granja tales como cerdos y ganado.

- Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona Compuestos de Fórmulas (IIa), (III) y (V), tal como se ha definido anteriormente en el presente documento para uso en el tratamiento de infección bacteriana en animales humanos o no humanos, con la necesidad de dicha terapia. Los compuestos de la invención se pueden combinar con otros agentes antibacterianos conocidos o se pueden combinar en conjunto. Se observará que un compuesto de la presente invención que tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana, que incluye actividad frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas será de uso general en la comunidad para el tratamiento empírico de infecciones adquiridas por la comunidad. En comparación, un compuesto de la presente invención con un espectro más limitado, por ejemplo actividad frente a bacterias Gram positivas, se va a usar con más probabilidad en circunstancias en las que se ha identificado el organismo patógeno causante.
- La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmulas (IIa), (III) o (V) junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En el presente documento se desvelan y/o reivindican composiciones farmacéuticas que comprenden combinaciones de compuestos de fórmula (I)-(XI) junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede incluir un compuesto de fórmula (VII) y un compuesto de fórmula (IX) en combinación con el vehículo o excipiente.
- Los compuestos de fórmulas (IIa), (III) y (V) se proporcionan para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en mamíferos, especialmente en seres humanos y en animales domesticados. La infección bacteriana puede ser una infección originada por *Clostridium* y a menudo es una infección por *Clostridium difficile*.
- La invención proporciona adicionalmente el uso de un compuesto de fórmulas (IIa), (III) o (V) en la preparación de una composición de medicamento para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.
- Los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden formular para administración de cualquier modo conveniente para uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros antibióticos.
- Los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden formular para administración mediante cualquier vía, por ejemplo oral, tópica, parenteral, o rectal. Las composiciones, por ejemplo, se pueden preparar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, cremas, supositorios, pomadas, geles, lociones, jarabes, o preparaciones líquidas, por ejemplo soluciones o suspensiones, que se pueden formular para uso oral o en forma estéril para administración parenteral mediante inyección o infusión.
- Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden estar en forma de dosificación individual, y pueden contener excipientes convencionales que incluyen, por ejemplo, agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo lauril sulfato sódico. Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.
- Las preparaciones líquidas orales pueden estar en la forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar en forma de un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, que incluyen, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulgentes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendras, ésteres oleosos (por ejemplo glicerina), propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo o ácido sórbico; y, si se desea, agentes convencionales saborizantes y colorantes.
- Las composiciones de acuerdo con la invención destinadas a la administración tópica, por ejemplo, pueden estar en forma de pomadas, cremas, lociones, pomadas oculares, gotas oculares, gotas para los oídos, apósitos impregnados, y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales apropiados, que incluyen, por ejemplo, conservantes, y disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en pomadas, geles, y cremas. Dichas formulaciones tópicas también pueden contener vehículos convencionales compatibles, por ejemplo bases de crema o pomada, y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos pueden constituir de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 98 % en peso de la formulación; más habitualmente constituirán hasta aproximadamente un 80 % en peso de la formulación.
- Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden formular como supositorios, que pueden contener bases convencionales para supositorio, por ejemplo manteca de cacao u otros glicéridos.
- Las composiciones de acuerdo con la invención destinadas a la administración parenteral pueden estar convenientemente en formas fluidas de dosificación individual, que se pueden preparar usando el compuesto y un vehículo estéril, siendo preferente el agua. El compuesto, dependiendo del vehículo y de la concentración usados, se puede suspender o disolver en el vehículo. En la preparación de soluciones, el compuesto se puede disolver en

5 agua para inyección y esterilizar por filtración antes de ser cargado en un vial o ampolla adecuados, que a continuación se cierra herméticamente. De forma ventajosa, los aditivos convencionales que incluyen, por ejemplo, anestésicos locales, conservantes, y agentes de tamponamiento se pueden disolver en el vehículo. Para potenciar la estabilidad de la solución, la composición se puede congelar después de ser cargada en el vial, y retirar el agua al vacío; el polvo seco liofilizado resultante se puede cerrar herméticamente a continuación en el vial y se puede suministrar un vial adjunto de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso. Las suspensiones parenterales se pueden preparar básicamente de la misma manera excepto en que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y la esterilización no se puede conseguir por filtración. El compuesto se puede esterilizar preferentemente por exposición a óxido de etileno antes de ser suspendido en el vehículo estéril. De forma ventajosa, en dichas suspensiones se incluye un tensioactivo o un agente humectante para facilitar la distribución uniforme del compuesto.

10 Un compuesto o composición de acuerdo con la invención se puede administrar adecuadamente al paciente en una cantidad antibacterianamente eficaz. En algunos casos, los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención se administran en una cantidad eficaz para tratar a un paciente con una infección por *Clostridium* y en particular una infección por *Clostridium difficile*.

15 Una composición de acuerdo con la invención puede contener adecuadamente un 0,1 % en peso, preferentemente de un 10 a un 60 % en peso, de un compuesto de acuerdo con la invención (basado en el peso total de la composición), dependiendo del procedimiento de administración.

20 Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden administrar adecuadamente al paciente a una dosificación diaria de 1,0 a 100 mg/kg de peso corporal. Para un ser humano adulto (de aproximadamente 70 kg de peso corporal), se pueden administrar diariamente de 50 a 3000 mg, por ejemplo aproximadamente 1500 mg, de un compuesto de acuerdo con la invención. Adecuadamente, la dosificación para seres humanos adultos es de 5 a 40 mg/kg al día. Dosificaciones mayores o menores, sin embargo, se pueden usar de acuerdo con la práctica clínica habitual.

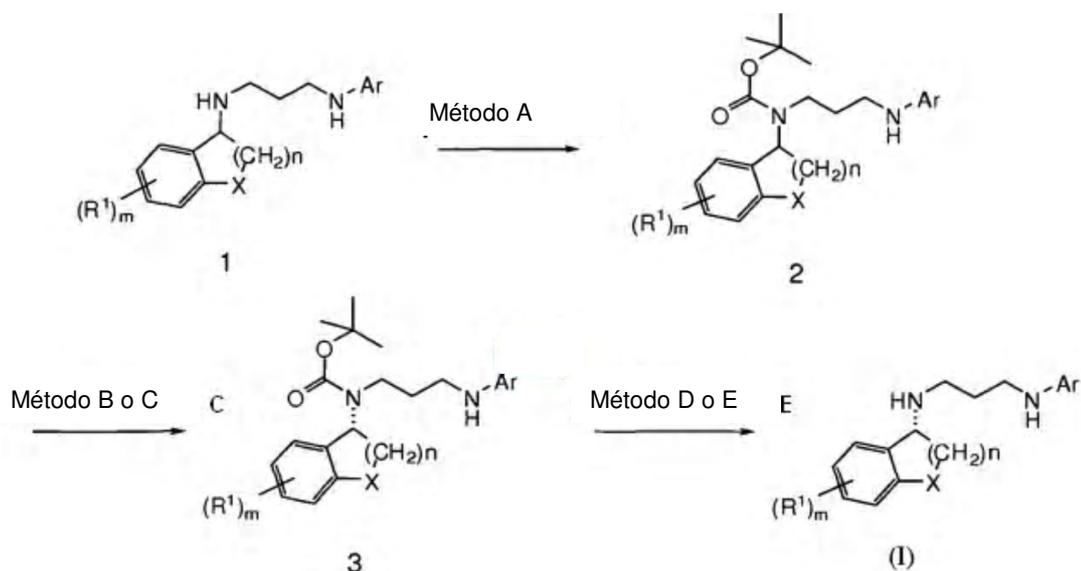
25 Cuando las composiciones de acuerdo con la invención se presentan en forma de dosificación individual, cada dosis individual puede comprender adecuadamente de 25 a 1000 mg, preferentemente de 50 a 500 mg, de un compuesto de acuerdo con la invención.

### Ejemplos

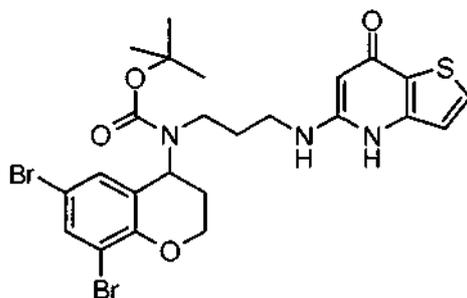
30 Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo para fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

#### **Ejemplo 1: Procedimientos de síntesis (separación quiral y síntesis asimétrica catalítica)**

35 Los siguientes ejemplos y experimentos describen la forma y el procedimiento para la preparación y el uso de los compuestos de la presente invención y compuestos relacionados, y son ilustrativos en lugar de limitantes. Los compuestos de la presente invención, sales de los mismos, y sus compuestos intermedios se pueden preparar o fabricar tal como se describe en el presente documento o mediante diversos procedimientos conocidos por estar presentes en la técnica química.

**Procedimiento 1: Síntesis mediante separación quiral:**Procedimiento I*Método A:*

- 5 Preparación del Éster terc-butílico del ácido (6,8-dibromo-croman-4-il)-[3-(7-oxo-4,7-dihidro-tieno[3,2-b]piridin-5-ilamino)-propil]-carbámico



- 10 La 5-[3-(6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona se preparó en forma de una mezcla racémica de acuerdo con procedimientos que se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con Número de Serie 11/853.314, titulada "Compuestos de Tienopiridona Sustituida con Actividad Antibacteriana", presentada el 11 de Septiembre de 2007 y combinada con tetrahidrofurano (0,02 M) y 1,5 equivalentes de hidruro sódico (en forma de una suspensión al 60 % en aceite mineral). Se permitió la agitación de la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron en porciones 1,04 equivalentes de Boc-anhídrido. Después de completar la adición, se permitió la agitación de la reacción durante una noche. El disolvente se retiró y el material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de un 0-100 % de acetato de etilo y hexanos para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo.

*Método B:*

- 20 Las mezclas racémicas que se han descrito anteriormente se separaron en los enantiómeros individuales por cromatografía quiral preparativa (HPLC prep). Para el éster terc-butílico del ácido (6,8-Dibromo-croman-4-il)-[3-(7-oxo-4,7-dihidro-tieno[3,2-b]piridin-5-ilamino)-propil]-carbámico, se aislaron lotes de 300 mg del primer enantiómero (R-(+)-enantiómero (fórmula IX)) y del segundo (S-(-)-enantiómero) de elución, ambos con un e.e. > 99 %.

Condiciones de HPLC Preparativa

Columna	: Chiralpak AD; 250 x 20 mm; Diacel Chemical Industries LTD
Eluyente	: Heptano/EtOH (90/10)
Flujo	: 6,0 ml/min

## ES 2 429 289 T3

UV	: 256 nm
Muestra	: 50 mg/ml
Volumen de inyección	: 500 µl
Tiempo de Retención	: R-(+)-enantiómero, ~ 37 min S-(-)-enantiómero, ~ 47 min

### Condiciones de HPLC Analítica

=

Columna	: Chiralpak OD-H; 150 x 4,6 mm; Diacel Chemical Industries LTD
Eluyente	: Heptano/IPA (90/10)
Flujo	: 0,5 ml/min
UV	: 256, 328 nm
Muestra	: ~ 1 mg/ml
Volumen de inyección	: 20 µl
Tiempo de Retención	: R-(+)-enantiómero, ~ 41 min S-(-)-enantiómero, ~ 46 min

### *Método C:*

- 5 Las mezclas racémicas de 6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il(3-(7-oxo-4,7-dihidrotieno[3,2-b]piridin-5-ilamino)propil)carbamato de terc-butilo preparadas de forma similar como en el *procedimiento A* se separaron en enantiómeros individuales por cromatografía quiral preparativa (HPLC prep). Se aislaron un lote de 113 mg del primer enantiómero de elución (fórmula VIII, R-(+)-enantiómero, e.e. > 99 %) y un lote de 70 mg del segundo enantiómero de elución (S-(-)-enantiómero, con e.e. de un 85 %). La purificación adicional de este segundo enantiómero de elución mediante una segunda ejecución preparativa proporcionó 5,5 mg de este enantiómero con un e.e. > 99 %.

### Condiciones de HPLC Preparativa

Columna	: Chiralpak OH-D; 250 x 20 mm; Diacel Chemical Industries LTD
Eluyente	: Heptano/EtOH/Et <sub>2</sub> NH (95/5/0,2 %)
Flujo	: 10 ml/min
UV	: 256, 328 nm
Muestra	: 85 mg/ml
Volumen de inyección	: 80 µl

### Condiciones de HPLC Analítica

Columna	: Chiralpak OD-H; 150 x 4,6 mm; Diacel Chemical Industries LTD
Eluyente	: Heptano/IPA (90/10)
Flujo	: 0,5 ml/min
UV	: 256, 328 nm
Muestra	: ~ 1 mg/ml
Volumen de inyección	: 20 µl
Tiempo de Retención	: R-(+)-enantiómero, ~ 41 min S-(-)-enantiómero, ~ 46 min

15

### *Método D:*

El éster terc-butílico del ácido ((R)(+)-6,8-Dibromo-croman-4-il)-[3-(7-oxo-4,7-dihidro-tieno[3,2-b]piridin-5-ilamino)-propil]-carbámico se recogió en HCl 4,0 M en dioxano y se permitió la agitación durante una noche, durante la que el

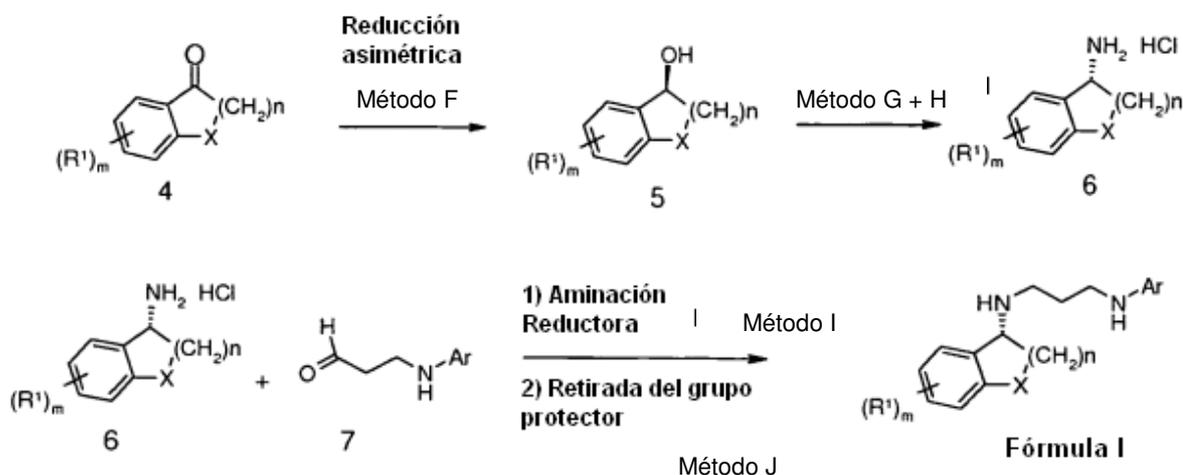
producto oleoso se retiró de la solución. Aproximadamente la mitad del dioxano se retiró mediante evaporación y el restante se agitó durante varias horas. El producto precipitó de la solución en forma de un sólido de color blanquecino (este sólido se aisló por filtración al vacío y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino).

#### 5 Método E:

El éster terc-butílico del ácido ((R)(+)-6,8-Dibromo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-il)-[3-(7-oxo-4,7-dihidro-tieno[3,2-b]piridin-5-ilamino)-propil]-carbámico se trató con HCl (solución 4,0 M preparada con HCl concentrado en THF). Esto se dejó en agitación durante la noche. El disolvente se retiró mediante evaporación y el sólido resultante de color blanco se agitó con éter. El sólido se aisló por filtración al vacío. El sólido se aisló y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (este sólido se aisló por filtración al vacío y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino).

Procedimiento II: Síntesis mediante reducción asimétrica

#### Procedimiento II



15 **Preparación de la sal de HCl de benzoato del 5-(3-oxopropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo, un ejemplo del compuesto 7**

#### Preparación de la 2,2-Dimetil-5-(metilsulfanil-tiofeno-3-ilaminometileno)-[1,3]dioxano-4,6-diona intermedia

20 Se mezcló isotiocianato de 3-tiofeno (472,5 g, 3,34 moles) con 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (433,2 g, 3,006 moles) en dimetilsulfóxido (1,9 l). Se añadió gota a gota trietilamina (516 ml, 3,67 moles) durante 130 min. mientras que se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 20 °C. Después de la adición, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió yodometano (426,7 g, 3,006 moles) lentamente durante 70 min mientras que la temperatura de reacción se mantenía por debajo de 20 °C. Después de la adición completa, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Una solución acuosa de ácido clorhídrico diluido (4,8 l de agua que contenía 46 ml de HCl al 37 %) se añadió lentamente para precipitar el producto mientras que la temperatura se mantenía por debajo de 30 °C. La mezcla se agitó durante 2 h. Los sólidos se filtraron y se aclararon con agua. Los sólidos húmedos resultantes se suspendieron en EtOH (6 l) y a continuación los disolventes se retiraron a presión reducida. La suspensión resultante se disolvió en metanol en ebullición (4,0 l) y se trató con carbón vegetal decolorante (marca Norit, 130 g) y se mantuvo a reflujo durante 40 min. La solución caliente se filtró a través de una capa de Celite 543 y la torta de filtro se aclaró con metanol en ebullición (1 l). El filtrado se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 h. Los sólidos se filtraron y secaron para producir 408,4 g (45 %) de cristales de color marrón claro de la 2,2-Dimetil-5-(metilsulfanil-tiofeno-3-ilamino-metileno)-[1,3]dioxano-4,6-diona intermedia. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,76 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 7,09 (d, 1H, J = 5 Hz), 7,25 (d, 1H, J = 3,2 Hz), 7,38 (dd, 1H, J = 3,2, 5 Hz), 12,7 (s a, 1H).

#### 35 Preparación de la 5-((3,3-Dietoxipropilamino)(tiofeno-3-ilamino)metileno)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona intermedia

40 Se añadió 3,3-dietoxipropilamina (210,7 g, 1,43 moles) en porciones a la solución de 2,2-dimetil-5-(metil-sulfanil-tiofeno-3-ilamino-metileno)-[1,3]dioxano-4,6-diona (407,3 g, 1,36 moles) en diclorometano (1,7 l) y metanol (0,36 l) durante 60 min, mientras que la temperatura de reacción se mantenía por debajo de 25 °C con un baño de agua. Después de agitar durante 1,5 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (0,8 l).

La fase orgánica se separó y se lavó con solución acuosa de cloruro de amonio (400 ml, preparada con 200 ml de NH<sub>4</sub>Cl sat. y 200 ml de agua) y salmuera (300 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La concentración de la mezcla de reacción a presión reducida produjo un aceite oscuro. Se añadieron xilenos (500 ml) y la mezcla se concentró a presión reducida para dar la 5-((3,3-Dietoxipropilamino)(tiofeno-3-ilamino)metileno)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona intermedia. El aceite resultante de color oscuro se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,65 (m, 6H), 1,73 (s, 6H), 1,78 (m, 2H), 2,98 (c, 2H, J = 6,4 Hz), 3,45 (m, 2H), 3,60 (m, 2H), 4,50 (t, 1H, J = 5,2 Hz), 6,98 (dd, 1H, J = 1,6, 5,2 Hz), 7,05 (dd, 1H, J = 1,2, 3,2 Hz), 7,33 (dd, 1H, J = 3,2, 5,2 Hz), 10,2 (s, 1H), 11,3 (s, 1H).

#### Preparación del ácido 5-(3,3-Dietoxipropilamino)-7-oxo-4,7-dihidrotieno[3,2-b]piridin-6-carboxílico intermedio

Se suspendió 5-((3,3-dietoxipropilamino)(tiofeno-3-ilamino)metileno)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (1,62 moles) en una solución de hexametildisilazano (1,08 l, 5,18 moles) en xilenos (2,4 l) y se calentó a reflujo durante 24 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró a presión reducida para producir un aceite oscuro. El aceite oscuro se trató cuidadosamente con metanol (0,5 l) para formar sólidos de color marrón, seguido de la adición de éter etílico (1,6 l). Los sólidos resultantes se filtraron y se lavaron con MeOH/Éter (1:3) (0,8 l). Los sólidos se secaron al vacío para producir 432,2 g (78 %) del ácido 5-(3,3-Dietoxipropilamino)-7-oxo-4,7-dihidrotieno[3,2-b]piridin-6-carboxílico deseado en forma de un sólido de color beige. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 1,09 (m, 6H), 1,91 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,58 (m, 2H), 4,06 (s, 1H), 4,60 (t, 1H, J = 5,2 Hz), 7,28 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 9,94 (m, 1H), 11,8 (s, 1H).

#### Preparación del 5-(3,3-Dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-olato sódico intermedio

Se mezcló ácido 5-(3,3-dietoxipropilamino)-7-oxo-4,7-dihidrotieno[3,2-b]piridin-6-carboxílico (432 g, 1,27 moles) con metóxido sódico (puro en un 95 %, 75,8 g, 1,33 moles) y se suspendió en xilenos (2 l). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió gradualmente a temperatura ambiente con agitación para producir sólidos de color marrón claro. Los sólidos se recogieron por filtración y se lavaron con tolueno y se secó al vacío a 50-60 °C durante 48 h para dar el 5-(3,3-dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-olato sódico intermedio deseado (un sólido). Este producto en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 1,08 (m, 6H), 1,72 (c, 2H, J = 6,8 Hz), 3,15 (m, 2H), 4,55 (t, 1H, J = 6 Hz), 6,22 (s, 1H), 6,98 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 7,53 (d, 1H, J = 5,2 Hz).

#### Preparación del Benzoato de 5-(3,3-dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo intermedio

Se suspendió 5-(3,3-dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-olato sódico (445,7 g, 1,40 moles) en DMSO (2,8 l). Se añadió anhídrido benzoico (332,9 g, 1,47 moles) en porciones a temperatura ambiente. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (6 l). La solución orgánica resultante se lavó con agua (6 l). La fase acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (2 l). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se filtró. La retirada del disolvente a presión reducida y el secado al vacío produjo el Benzoato de 5-(3,3-dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo intermedio en forma de un aceite oscuro. Este producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,09 (m, 6H), 1,99 (m, 2H), 3,50 (m, 4H), 3,70 (m, 2H), 4,60 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,30 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 7,55 (m, 3H), 7,67 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 8,24 (m, 2H).

#### Preparación del compuesto del título de la sal de HCl de benzoato de 5-(3-oxopropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo, un ejemplo del compuesto 7

El benzoato de 5-(3,3-dietoxipropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo en bruto anterior (677,3 g, 1,68 moles) se disolvió en 3,0 l de THF. A continuación, se añadió gota a gota HCl 12 N (1,68 moles, 0,14 l) mientras que la temperatura de reacción se mantenía por debajo de 20 °C con un baño de hielo-agua. Después de agitar durante 5 minutos, precipitaron los sólidos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de la adición de acetato de etilo (2,0 l). La mezcla se agitó durante 30 min. Los sólidos se filtraron, se aclaró con acetato de etilo (250 ml X 2), y a continuación se secó a presión reducida a 55 °C para dar el compuesto del título de sal de HCl de benzoato de 5-(3-oxopropilamino) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo en forma de un sólido de color marrón claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 2,20 (m, 2H), 3,56(m, 2H), 6,31 (t, 1H, J = 3,6 NHz), 7,83-7,87 (m, 2H), 7,96 (d, 1H, J = 6,0 Hz), 8,16-8,20 (m, 2H), 8,35 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 10,20 (s, 1H).

#### Método F:

#### Preparación de 6,8-Dibromo-croman-4(S)-ol

A una mezcla que contenía 6,8-dibromocroman-4-ona en acetonitrilo (0,3 M) y ácido fórmico/trietilamina a 5/2 (30 % en volumen) se añadió (1S,2S)-(+)-N-p-tosil-1,2-difeniletlen diamina (1 % en moles) y dímero de dicloro(p-cimeno)-rutenio (II) (0,5 % en moles). Después de agitar durante 24 h, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera/bicarbonato sódico (1:1). La fase orgánica se concentró a presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color castaño. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 4,78 (ABc, 1H), 4,38 (m, 2H), 2,08 (m, 2H), 1,91 (d, 1H).

Método G:

**Preparación de 4(R)-Azido-6,8-dibromo-cromano**

Una solución que contenía 6,8-dibromo-croman-4(S)-ol en tetrahidrofurano (0,17 M) y 1,2 equivalentes de difenilfosforilazida se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución se enfrió a 10 °C y se añadieron 2,5 equivalentes de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno. La mezcla se agitó con calentamiento gradual a temperatura ambiente y se mantuvo durante 48 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera seguido de agua. La fase orgánica se concentró para producir el compuesto del título en forma de un aceite de color castaño. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,65 (d, 1H), 7,32 (d, 1H), 4,57 (t, 1H), 4,43 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,08 (m, 1H).

10 Método H:

**Preparación de Clorhidrato de 6,8-dibromo-croman-4(R)-ilamina**

A una solución enfriada con hielo de 4(R)-azido-6,8-dibromo-cromano en tetrahidrofurano (0,16 M) se añadieron 1,2 equivalentes de trimetilfosfina. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se mantuvo durante 16 h. La concentración de la mezcla dio la amina en bruto. Esto se disolvió en acetonitrilo (0,20 M) y se añadieron 2 equivalentes de ácido clorhídrico. La mezcla se agitó durante 16 h y los sólidos se filtraron, se lavó con acetonitrilo y se secó para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,75 (d, 1H), 7,60 (dd, 1H), 4,62 (t, 1H), 4,40 (m, 2H), 2,40 (m, 1H), 2,20 (m, 1H).

Método I:

**Preparación de Benzoato 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamina) propilamino]-tieno[3,2-b]piridin-7-ilo**

20 Se mezcló la sal de clorhidrato de benzoato de 5-(3-oxopropilamina) tieno[3,2-b]piridin-7-ilo con 1 equivalente de clorhidrato de 6,8-dibromo-croman-4(R)-ilamina en tetrahidrofurano (0,35 M) seguido de la adición de 3 equivalentes de trietilamina. Después de agitar durante 1 h, se añadieron 1,3 equivalentes de triacetoxiborohidruro sódico y la mezcla se agitó durante 2 h. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato sódico acuoso. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio. La filtración, retirada de disolvente y purificación del producto en bruto por cromatografía en columna eluyendo con metanol al 0-10 % en diclorometano dio el compuesto del título en forma de un aceite de color marrón. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 (m, 2H), 7,70 (m, 1H), 7,56 (m, 3H), 7,50 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,24 (d, 1H), 6,58 (m, 1H), 4,34 (m, 2H), 3,77 (t, 1H), 3,56 (m, 2H), 2,85 (m, 2H), 2,0 (m, 2H).

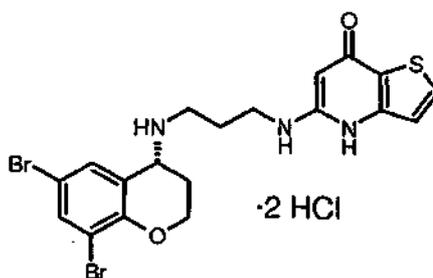
Método J:

30 **Preparación de Diclorhidrato de 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamina) propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona**

A una solución que contenía benzoato de 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamina) propilamino]-tieno[3,2-b]piridin-7-ilo en acetato de etilo (2,5 M) y tetrahidrofurano (1,2 M) se añadieron 2,5 equivalentes de amoníaco 2 M en metanol. Después de agitar durante 24 h, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y los sólidos se filtraron, se aclaró con acetato de etilo y se secó. La purificación del material en bruto por cromatografía en columna eluyendo con amoníaco/metanol al 0-10 % en diclorometano dio el compuesto del título en forma de la base libre. Esto se disolvió en etanol absoluto (0,4 M) y se añadieron 3 equivalentes de ácido clorhídrico 4 N. La mezcla se calentó a 75 °C y se trató con carbón vegetal decolorante. La mezcla resultante se filtró a través de una capa de Celite y el lecho del filtro se aclaró con etanol/ácido clorhídrico 4 N caliente. El filtrado se agitó durante 16 h a temperatura ambiente hasta que se formaron sólidos incoloros. Los sólidos se filtraron, se aclaró con etanol/ácido clorhídrico 2 N y se secó al vacío a 95-100 °C para producir el compuesto objetivo en forma de un sólido de color blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,04 (d, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,62 (s a, 1H), 4,52-4,38 (m, 2H), 3,59 (t, 2H), 3,41 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 2,18 (m, 2H).

**Ejemplo 2: Síntesis de Diclorhidrato de 5-[3-(R)(+)6,8-dibromo-croman-4-ilamino propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (fórmula IX, un compuesto relacionado con compuestos de la invención)**

45 Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Procedimiento 1 (métodos A, B y D), se preparó el compuesto del título y se aisló en forma del primer enantiómero de elución. Como alternativa, el compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II (procedimientos F-J). El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino en ambos casos.

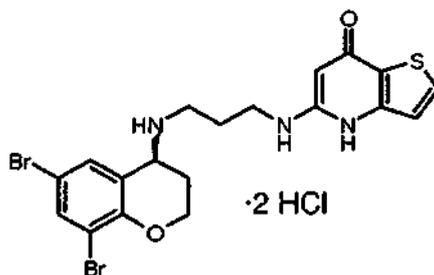


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,04 (d, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,62 (s a, 1H), 4,52-4,38 (m, 2H), 3,59 (t, 2H), 3,41 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 2,18 (m, 2H). MS (ES $^+$ ): M/Z 514 (M+1). Rotación óptica:  $[\alpha]_{589} = + 23,06$  (c = 0,503 mM en MeOH, 20  $^\circ\text{C}$ ).

- 5 Se cultivaron co-cristales de Diclorhidrato de 5-[3-((R)(+)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (fórmula IX) y MetRS de *Clostridium difficile*. La difracción por rayos X de los co-cristales proporcionó un patrón de resolución a 1,72 Å. A la estructura tridimensional del compuesto IX se le asignó inequívocamente la configuración absoluta R.

10 **Ejemplo 3: Síntesis de Diclorhidrato de 5-[3-((S)(-)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (compuesto comparativo)**

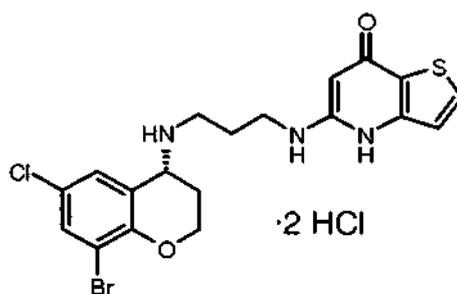
- Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Procedimiento 1 (métodos A, B y D), se preparó el compuesto del título y se aisló en forma del segundo enantiómero de elución. Como alternativa, el compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II en el que, en el Método F, se usó (1R,2R)-(-)-N-p-tosil-1,2-difeniletilén diamina (1 % en moles) y dímero de dicloro(p-cimeno)-rutenio (II), seguido de los procedimientos G-J. El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino en ambos casos.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,04 (d, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,62 (a, t, 4,52-4,38 (m 2H), 3,59 (t, 2H), 3,41 (m, 1H), 3,27 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 2,17 (m, 2H). MS (ES $^+$ ): M/Z 514 (M+1). Rotación óptica:  $[\alpha]_{589} = - 21,70$  (c = 0,507 mM en MeOH, 20  $^\circ\text{C}$ ).

20 **Ejemplo 4: Síntesis de Diclorhidrato del 5-[3-((R)(+)-8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (fórmula VII, un compuesto relacionado con compuestos de la invención)**

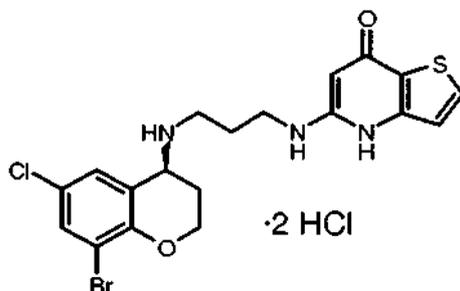
Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Ejemplo 1 (métodos A, B y D), se preparó el compuesto del título y se aisló como el primer enantiómero de elución:



- 25 RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,05 (d, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,43 (d, 1H), 6,25 (s, 1H), 4,62 (t, 1H), 4,52-4,38 (m, 2H), 3,58 (t, 2H), 3,39 (m, 1H), 3,29 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 2,17 (m, 2H). MS (ES $^+$ ): M/Z 470 (M+1). Rotación óptica:  $[\alpha]_{589} = + 36,86$  (c = 0,510 mM en MeOH, 20  $^\circ\text{C}$ ).

**Ejemplo 5: Síntesis de Diclorhidrato de 5-[3-((S)-8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (compuesto comparativo)**

Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Procedimiento 1 (métodos A, B y D), se preparó el compuesto del título y se aisló en forma del segundo enantiómero de elución:



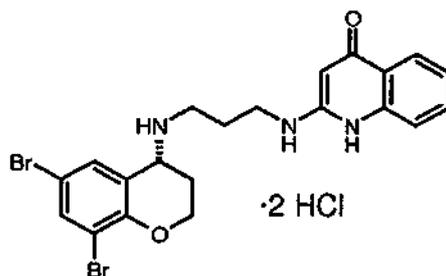
5

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,05 (d, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,26 (s, 1H), 4,63 (t, 1H), 4,52-4,38 (m, 2H), 3,57 (t, 2H), 3,41 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 2,42 (m, 2H), 2,18 (m, 2H). MS (ES<sup>+</sup>): M/Z 470 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = - 35,24 (c = 0,500 mM en MeOH, 20 °C).

**Ejemplo 6: Síntesis de Diclorhidrato de 2-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-1H-quinolin-4-ona (fórmula X, un compuesto relacionado con compuestos de la invención)**

10

Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Ejemplo 1 (métodos A, B y D), se preparó el compuesto siguiente y se aisló como el primer enantiómero de elución.

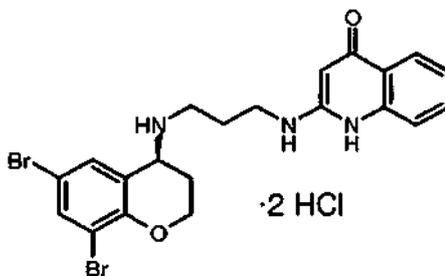


15 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,10 (d, 1H), 7,90 (a, 1H), 7,78-7,75 (m, 3H), 7,48 (t, 1H), 6,38 (s, 1H), 4,65 (t, 1H), 4,48 (m, 2H), 3,70 (m, 2H), 3,44 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,23 (m, 2H). MS (ES<sup>+</sup>): M/Z 508 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = + 23,22 (c = 0,500 mM en MeOH, 20 °C).

**Ejemplo 7: Síntesis de Diclorhidrato de 2-[3-((S)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-1H-quinolin-4-ona (compuesto comparativo)**

20

Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en el Ejemplo 1 (métodos A, B y D), se preparó el siguiente compuesto y se aisló en forma del segundo enantiómero de elución:

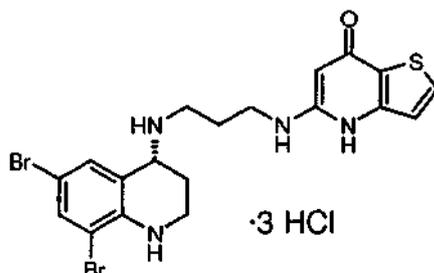


RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,10 (d, 1H), 7,90 (a, 1H), 7,78-7,75 (m, 3H), 7,48 (t, 1H), 6,38 (s, 1H), 4,65 (t, 1H), 4,48 (m, 2H), 3,70 (m, 2H), 3,44 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,23 (m, 2H). MS (ES<sup>+</sup>): M/Z 508 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = - 24,51 (c = 0,506 mM en MeOH, 20 °C).

25

**Ejemplo 8: Síntesis de Triclorhidrato de 5-[3-((R)(+)-6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilmano]-4H-tieno [3,2-b]piridin-7-ona (fórmula VIII, un compuesto relacionado con compuestos de la invención)**

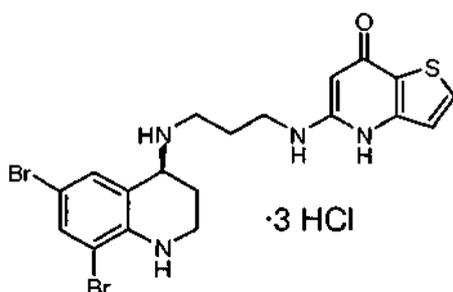
- 5 Usando las reacciones de síntesis tal como se describen en los Ejemplos 1 (métodos A, C y E), se preparó el siguiente compuesto y se aisló en forma del primer enantiómero de elución. Como alternativa, el compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II (procedimientos F-J). El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino en ambos casos.



- 10 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,05 (d, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 6,25 (s, 1H), 4,48 (s a, 1H), 3,63-3,53 (m, 4H), 3,38 (m, 1H), 3,21 (m, 1H), 2,43(m, 1H), 2,14 (m, 2H), 2,07 (m, 1H). MS (ES<sup>+</sup>): M/Z 513 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = + 72,26 (c = 0,507 mM en MeOH, 20 °C).

**Ejemplo 9: Síntesis de Triclorhidrato de 5-[3-((S)(-)-6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno [3,2-b]piridin-7-ona (compuesto comparativo)**

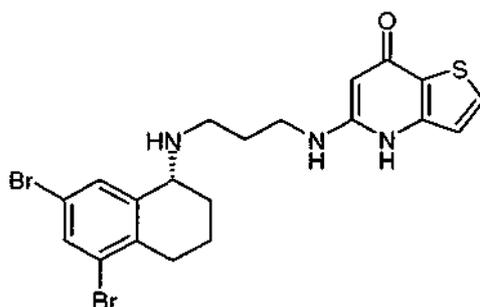
- 15 Usando las reacciones de síntesis tal como se describe en los Ejemplos 1 (métodos A, C y E), se preparó el siguiente compuesto y se aisló en forma del segundo enantiómero de elución. Como alternativa, el compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II en el que, en el Método F, se usó (1R,2R)-(-)-N-p-tosil-1,2-difeniletlen diamina (1 % en moles) y dímero de dicloro(p-cimeno)-rutenio (II), seguido de los procedimientos G-J. El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino en ambos casos.



- 20 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,04 (d, 1H), 7,58 s, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,42(s, 1H), 6,23 (s, 1H), 4,48 (s a, 1H), 3,63-3,52 (m, 4H), 3,37 (m, 1H), 3,22 (m, 1H), 2,42 (m, 1H), 2,20-2,00 (m, 3H). MS (ES<sup>+</sup>): M/Z 513 (M+1).

**Ejemplo 10: 5-[3-((R)-5,7-Dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-naftalen-1-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (fórmula VI, un compuesto de la invención)**

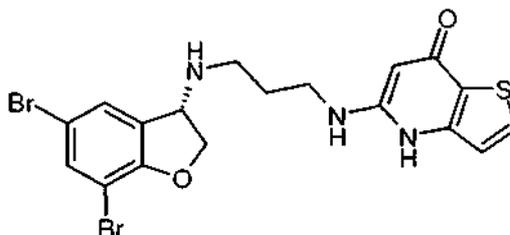
- 25 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II (métodos F-J). El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,68 (d, 1H), 7,59 (d, 2H), 7,00 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,80 (t, 1H), 3,32 (t, 2H), 2,76 (m, 3H), 2,61 (m, 1H), 1,97 (m, 1H), 1,86 (m, 4H), 1,72 (m, 1H). MS (ES+): M/Z 512 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = -2,30 (c = 0,870 mM en MeOH, 20 °C).

5 **Ejemplo 11: 5-[3-((S)-5,7-Dibromo-2,3-dihidro-benzofuran-3-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (fórmula XI, un compuesto de la invención)**

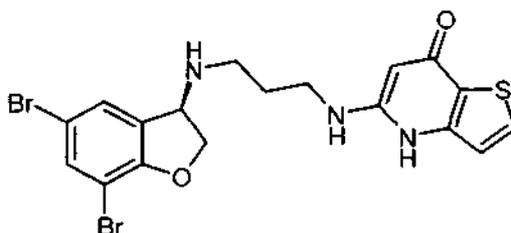
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II (métodos F-J). El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino.



10 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,46 (d, 2H), 7,06 (d, 1H), 5,54 (s, 1H), 4,60 (m, 2H), 4,47 (m, 1H), 3,30 (m, 2H), 2,73 (m, 1H), 2,61 (m, 1H), 1,80 (m, 2H). MS (ES+): M/Z 500 (M+1). Rotación óptica: [α]<sub>589</sub> = -1,93 (c = 0,725 mM en MeOH, 20 °C).

15 **Ejemplo 12: 5-[3-((R)-5,7-Dibromo-2,3-dihidro-benzofuran-3-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (compuesto comparativo)**

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el Procedimiento II en el que, en el método F, se usó (1R,2R)-(-)-N-p-tosil-1,2-difeniletlen diamina (1 % en moles) y dímero de dicloro(p-cimeno)-rutenio (II), seguido de los métodos G-J. El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanquecino.



20 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,70 (d, 1H), 7,48 (d, 2H), 7,06 (d, 1H), 5,56 (s, 1H), 4,63 (m, 2H), 4,50 (dd, 1H), 3,30 (m, 2H), 2,75 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 1,81 (m, 2H). MS (ES+): M/Z 500 (M+1).

25 **Ejemplo 13: Expresión y purificación de MetRS**

El siguiente ejemplo ilustra la expresión y la purificación de MetRS de *C. difficile* útil en los ensayos funcionales que se muestran en los ejemplos 14 y 15.

25 **Clonación de vector sobreproductor:** Se amplificó MetRS de *C. difficile* marcada con hexaHis en el extremo N-terminal y se clonó en pETcoco-2. Los siguientes cebadores se usaron para amplificar ADN a partir de ADN genómico: 5'-CTGCAGAGCTAGCAAAC-CGAGTTTTTATGTAAC-3' (directo) (SEC ID N<sup>o</sup>: 1), 5'-CTTTCTAAGCTTCTACTAACGAACCTCGGATCC-3' (inverso) (SEC ID N<sup>o</sup>: 2). El ADN amplificado se trató con Sph1 y endonucleasas de restricción HindIII, que se inactivaron por calor después de la digestión. El fragmento se precipitó con etanol y se combinó con el vector pETcoco-2 (Novagen) que se había tratado con las mismas enzimas más fosfatasa alcalina de gamba. Los fragmentos se ligaron y la mezcla de ligado se transformó en *E. coli* DH10 competente. Los transformantes se sembraron en medio F más glucosa con 50 ug/ml de ampicilina. El crecimiento en glucosa mantiene el estado reprimido del promotor pBAD que activa la expresión del replicador TrfA, manteniendo de este modo un bajo número de copias. El clon de expresión resultante, pETcoco-Cdiff-MRS, se confirmó por secuenciación del inserto en ambas direcciones.

35 **Purificación de MetRS de *C. difficile*.** El vector de expresión pETcoco-Cdiff-MRS se transformó en la cepa de expresión Rosetta DE3 y se usó para inocular 4 litros de medios F complementados con 10 ug/ml de cloramfenicol, 50 ug/ml de ampicilina, glucosa al 0,2 %. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM a una DO de 0,66. Las células se recogieron a las 4 horas después de la inducción (rendimiento = 38 g de sedimento celular). Las células sedimentadas se lisaron por adición de 78 g de una suspensión 1:1 de células congeladas (39 g de células) en Tris-sacarosa que se había almacenado a -20 °C a 107,25 ml de tampón Tris-sacarosa que se había calentado

5 previamente a 45 °C (2,75 ml/g de células). A la mezcla agitada, se añadieron 1,95 ml de 1,4-ditiotreitol 0,5 M (DTT) (0,05 ml/g de células) y 9,75 ml de tampón de lisis (NaCl 2 M, espermidina 0,3 M en Tris-sacarosa ajustado a pH 7,5) (0,25 ml/g de células). El pH de la suspensión se sometió a ensayo con papel de pH y se ajustó a pH 8,0 añadiendo 50 ml de base Tris 2 M. Se añadió lisozima (117 mg) en 20 ml de tampón Tris-sacarosa (3 mg de lisozima/g de células). La suspensión se distribuyó en frascos de centrifuga y se incubó a 4 °C durante 1 hora, seguido de incubación a 37 °C durante 4 minutos. Los componentes celulares insolubles se retiraron por centrifugación (23.000 x g, 60 minutos, 4 °C). El sobrenadante recuperado (192 ml) constituía la Fracción I. La Fracción I se cargó en una columna de Ni-NTA de 15 ml que se equilibró en Tampón de Carga (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, KCl 40 mM, imidazol 10 mM, pH 6,8, y beta mercaptoetanol 7 mM). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de Tampón de Lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, KCl 800 mM, imidazol 20 mM, pH 6,8, y beta mercaptoetanol 7 mM). La proteína se eluyó en gradiente de 10 volúmenes de columna de Tampón de Lavado a Tampón de Elución (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, KCl 40 mM, imidazol 250 mM, pH 6,8, y beta mercaptoetanol 7 mM) a 0,5 ml/min recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones se recogieron y se analizaron para la determinación de proteína por SDS-PAGE. Las fracciones se sometieron a ensayo en el ensayo de carga de MetRS-ARNt de *C. difficile*. Las fracciones que contenían el pico de actividad se agruparon para formar la Fracción II (60 mg en 1,3 mg/ml). La Fracción II tenía una actividad específica de  $3,2 \times 10^5$  unidades por miligramo. La pureza se estimó superior a un 97 % basada en la densitometría de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

#### Ejemplo 14: Los Compuestos enantiómeros son inhibidores potentes de MetRS de *C. difficile*

20 Los compuestos se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inhibir MetRS. Los ensayos se realizaron como sigue a continuación:

#### Mezcla de Reacción (por 1 ml)

Reserva	Volumen (µl)	Concentración Final
Tris/Cl 100 mM, pH 7,9	600	30 mM
KCl 250 mM		75 mM
ATP 125 mM	40	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> 250 mM	80	10 mM
DTT 50 mM	80	2 mM
Met 1 mM (H-3 caliente y frío)	20	10 µM
ARNt Sólido ( <i>E. coli</i> MRE 600 mezclada)	4 mg/ml	2 mg/ml
H <sub>2</sub> O	180	

10 x Inhibidor (0 - 100 µM) 5 µl por pocillo 0 - 10 µM.

25 Cada reacción se inició añadiendo 20 µl de enzima pura diluida apropiadamente (incubada previamente con inhibidor) a 25 µl de mezcla de reacción durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió mediante la adición de 150 µl de citrato sódico 167 mM, perlas de SPA que contenían fosfodiesterasa (PDE) a pH 2,15 (0,833 mg/ml). La unión del producto radiomarcado a la perla pone al isótopo en una proximidad lo suficientemente cercana como para permitir que la radiación del tritio excite el centelleador dentro de la perla. Cualquier radiomarca no unida no está lo suficientemente cerca del centelleador como para permitir esta transferencia de energía, de modo que no se genera ninguna señal. Después de la interrupción de la reacción, las placas se centrifugan a 2500 rpm durante 5 min en una centrifuga de placas Mistral 3000E (o como alternativa, se permite que repose durante 1 hora). El ensayo se realiza en Optiplates 96 pocillos (Packard). El recuento de las placas se hace en un TopCount. (Contador de 96 pocillos de Packard).

#### Reactivos

35 El ATP y el ARNt de *E. coli* MRE 600 mezclada se adquirieron en Boehringer-Mannheim, las perlas de centelleo por proximidad (SPA) de L-[metil-<sup>3</sup>H]metionina y fosfodiesterasa en Amersham Pharmacia Biotech y otros reactivos en Sigma.

#### Resultados

40 Los enantiómeros puros (ejemplos 2, 4, 6, 8, 10), todos los enantiómeros R, y el enantiómero S (ejemplo 11), presentaron una inhibición muy potente de MetRS de *Clostridium difficile* en el intervalo ( $K_i = 15-25$  pM). Todos fueron altamente selectivos con respecto a la enzima de mamífero (sin inhibición de MetRS de rata). Las mezclas racémicas de estos ejemplos presentaron aproximadamente una actividad de un 50 % inferior a la de los enantiómeros puros.

En comparación, los isómeros con la configuración opuesta (ejemplos 3, 5, 7, 9), todos los enantiómeros S, y el enantiómero R (ejemplo 12), presentaron una inhibición muy débil de MetRS de *Clostridium difficile* en el intervalo ( $K_i = 24.000-80.000 \text{ pM}$ ). Esta es una diferencia increíble no anticipada en la actividad entre los isómeros con la configuración opuesta. Además, estos datos indican que los compuestos de la presente invención muestran una fuerte selectividad hacia la inhibición de MetRS de *C. difficile*, pero tienen poca o ninguna actividad inhibitoria hacia MetRS de mamífero. Los inhibidores de MetRS son inhibidores competitivos de metionina e inhibidores no competitivos de ATP.

#### **Ejemplo 15: Los Compuestos enantiómeros tienen potente actividad antibacteriana frente a *C. difficile***

Los compuestos (fórmulas (VI) - (XI), compuestos relacionados con los compuestos de la invención tal como se reivindica, también se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *C. difficile*. Se determinó la CIM<sub>90</sub> (concentración inhibitoria mínima necesaria para inhibir el crecimiento de un 90 % de *C. difficile*) usando ensayos convencionales a base de agar de acuerdo con el CLSI.

**Organismos:** Todos los compuestos se sometieron a ensayo para la actividad antibacteriana frente a una colección de un grupo de aislados clínicos de no repetición de *C. difficile*. Los organismos se almacenaron congelados en caldo de Brucella complementado con glicerol al 20 %. Los organismos se recuperaron del congelador y se subcultivaron dos veces en agar CDC para asegurar la pureza y el crecimiento. Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas durante al menos 24 horas. Las colonias bacterianas se examinaron para determinar la morfología; color amarillo, textura de vidrio esmerilado y olor característico. El organismo de control sometido a ensayo fue *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

**Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana:** El ensayo de susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el procedimiento de dilución en agar sobre agar de Brucella complementado con vitamina K<sub>1</sub>, hemina y sangre lacada de oveja al 5 % de acuerdo con las directrices del CLSI (CLSI, M11-A2). Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie y se añadieron a agar de Brucella complementado fundido. Las placas sin fármaco se inocularon antes y después de la inoculación de cada serie de placas antimicrobianas y se usaron como controles del crecimiento. Los controles del crecimiento anaeróbico/aeróbico se realizaron en placas sin fármaco después de dos grupos de placas con fármaco. Las colonias bacterianas se suspendieron en caldo de Brucella hasta una turbidez igual a la del patrón de 0,5 de McFarland y se aplicaron a una placa con un replicador de Steers que administraba 10<sup>5</sup> CFU/mancha. Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 24 horas a 35 °C antes de la lectura de los resultados. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue la concentración que inhibía completamente el crecimiento o que causaba una reducción acentuada en la aparición de crecimiento en comparación con la del control de crecimiento sin fármaco.

**Resultados:** Los enantiómeros puros (ejemplos 2, 4, 6, 8, 10), todos los enantiómeros R, y el enantiómero S (ejemplo 11), presentaron una actividad antibacteriana muy potente frente a *Clostridium difficile* (CIM<sub>90</sub> = 0,25 µg/ml a 4,0 µg/ml). Las mezclas racémicas de estos ejemplos presentaron una actividad de aproximadamente un 50 % inferior a la de los enantiómeros puros (CIM<sub>90</sub> = 0,50 µg/ml a 8,0 µg/ml).

En comparación, los isómeros con la configuración opuesta (ejemplos 3, 5, 7, 9), todos los enantiómeros S, y el enantiómero R (ejemplo 12), presentaron una actividad antibacteriana muy débil frente a *Clostridium difficile* (CIM<sub>90</sub> = > 8,0 µg/ml a > 32,0 µg/ml).

Estos resultados indican una actividad potente de los compuestos enantioméricamente puros frente a *C. difficile*, por lo general aproximadamente de 0,25-1,0 µg/ml. Además, los datos de CI<sub>50</sub> indican que los compuestos son específicos para MetRS de *C. difficile*, mostrando poca o ninguna actividad frente a MetRS de mamífero. Los compuestos inhibidores de MetRS muestran una actividad potente frente a *C. difficile* y a bacterias gram positivas sin dañar la flora intestinal normal.

Los datos en estos ejemplos ilustran la eficacia antibacteriana potente e inesperada de los enantiómeros R puros enantiómeros en el caso de los ejemplos 2, 4, 6, 8, 10 y el enantiómero S del ejemplo 11 en comparación con la actividad muy débil de sus isómeros con la configuración opuesta (ejemplos 3, 5, 7, 9, 12).

#### **Ejemplo 16: Compuestos de la presente invención: potente actividad antibacteriana frente a otras bacterias**

Los compuestos relacionados con compuestos de la presente invención (ejemplos 2, 4, 6, 8, 10, y 11) se sometieron a ensayo para la actividad antibacteriana frente a un panel de bacterias Gram-positivas. Los compuestos se sometieron a ensayo frente a bacterias aeróbicas Gram-positivas usando el procedimiento de microdilución en caldo con referencia al CLSI. Los datos se obtuvieron frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Los compuestos sometidos a ensayo demostraron una potente actividad antibacteriana frente a todos los aislados con un intervalo de CIM < 0,008-8 µg/ml, incluyendo cepas resistentes de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes*. También se obtuvieron los datos frente a *Helicobacter*, *H. pylori* usando el procedimiento convencional de dilución en agar según las directrices del CLSI y los resultados indican que los compuestos de la invención son activos frente a *H. pylori*.

Los datos ilustraron la utilidad del uso de los compuestos de la presente invención como agentes antibacterianos frente a otras bacterias Gram-positivas, *por ejemplo*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, y *S. haemolyticus* y frente a la bacteria Gram-negativa *H. pylori*.

**Ejemplo 17: Compuestos de la presente invención: gran utilidad terapéutica durante los ensayos *in vivo*:**

5 Se realizaron estudios con animales para determinar la eficacia de los inhibidores de MetRS para tratar las infecciones por *C. difficile*. Los inhibidores de MetRS sometidos a ensayo fueron 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (tanto la mezcla racémica como el enantiómero R) y 5-[3-((R)-8-Bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona. También se sometió a ensayo la 2-(3-{3,5-Dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino}-propilamino)-1H-quinolin-4-ona. Estos compuestos están  
10 relacionados con los compuestos de la presente invención tal como se reivindica.

Se compararon los resultados con hámsteres infectados con *C. difficile* tratados con el antibiótico convencional, la vancomicina. Se trató a los hámsteres infectados con una solución o una suspensión de un inhibidor de MetRS de 5 a 50 mg/kg o vancomicina de 2, 5, 5 o 25 mg/kg. Ocho hámsteres por grupo llegaron vivos hasta el punto final del experimento. Se examinaron los hámsteres muertos para determinar la afección GI.

15 Los datos de los estudios indicaron que los hámsteres de control (infectados con *C. difficile*, pero que no recibieron tratamiento) murieron a los 3-4 días. Los animales tratados con inhibidores de MetRS presentaron un aumento significativo de la supervivencia, viviendo con frecuencia hasta la finalización del estudio, por lo general 28 días o más. Estos resultados fueron similares o superiores a los resultados obtenidos usando el tratamiento con vancomicina. La 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona demostró la mayor eficacia. La 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona presentó una  
20 eficacia superior a la de la vancomicina al observarse una supervivencia > 60 % en el Día 28 (5 mg/kg dos veces al día) en comparación con un 0-10 % de supervivencia con vancomicina. Los animales supervivientes tenían una histopatología y un aspecto GI saludable. En los hámsteres se observó biodisponibilidad y exposición sistémica bajas después de la administración oral de los inhibidores de MetRS.

25 Los datos en este Ejemplo ilustran que los compuestos relacionados con los compuestos de la presente invención eran comparables o superiores a la vancomicina con respecto a su capacidad para tratar animales infectados con *C. difficile*.

**Ejemplo 18: Compuestos de la presente invención: producción de toxinas en *C. difficile*:**

30 La patogenicidad de *C. difficile* está asociada con su capacidad para producir las toxinas extracelulares A y B. Las cepas hipertoxigénicas son responsables de brotes recientes con elevada mortalidad. Por el contrario, los aislados que no producen toxinas no son patógenos. Dado que la producción de toxinas requiere la síntesis activa de proteínas, se espera que la inhibición de la maquinaria de síntesis de proteínas suprima la producción de toxinas de *novo*. Por lo tanto, se evaluaron los inhibidores de MetRS para determinar su efecto sobre la producción de toxinas de *C. difficile in vitro*.

35 **Métodos:**

Se cultivó la cepa de *C. difficile* ATCC43255 y se mantuvo anaeróticamente en agar anaeróbico CDC (Remel, Lenexa, KS). Para someter a ensayo el efecto de los agentes antibacterianos en el crecimiento, se cultivaron las células anaeróticamente durante 40 horas a 35 °C en caldos de cultivo de infusión de cerebro y corazón (BHI) de 96 pocillos, con un inóculo inicial de 10<sup>6</sup> CFU/ml. Para someter a ensayo el efecto de los agentes antibacterianos en la  
40 producción de toxinas a altas densidades celulares de *C. difficile*, se cultivaron las células anaeróticamente durante 24 horas a 35 °C en caldos de cultivo de infusión de cerebro y corazón (BHI) de 96 pocillos. A continuación se reemplazó el medio consumido con caldo recién preparado que contenía agentes de control e inhibidores de MetRS en un intervalo de concentraciones de 0,015 - 16 µg/ml. Después de 4 días, se controlaron el crecimiento y la viabilidad celular mediante mediciones de la densidad óptica a 595 nm y mediante cultivo en agar anaeróbico CDC, respectivamente. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo, y se detectó la toxina A mediante ELIFA (ensayo de inmunofiltración ligado a enzimas) usando un anticuerpo monoclonal anti toxina A (Novus Biologicals, Centennial, CO).

Resultados:

45 Los inhibidores de MetRS 5-[3-(6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona y 5-(3-{3,5-Dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino}-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona que están relacionados con los compuestos de la invención tal como se reivindica, se impide el crecimiento de *C. difficile* en el caldo a concentraciones ≥ 0,25 µg/ml.

55 Se inhibió la producción de toxinas en cultivos en fase estacionaria de 4 días, en alta densidad celular mediante cuatro inhibidores de MetRS diferentes (5-[3-(6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona, 5-(3-{3,5-Dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino}-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona, diclorhidrato de R-(+)-5-[3-(6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona, triclóridrato de

5-[3-(6,8-Dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona) a concentraciones tan bajas como 0,25 µg/ml. Por el contrario, se necesitaron concentraciones mucho más altas ( $4 - > 16$  µg/ml) de los agentes comparadores (metronidazol, vancomicina, levofloxacina) para inhibir la producción de toxinas.

#### Conclusiones:

5 Los inhibidores de MetRS demuestran efectos inhibidores tanto en el crecimiento como en la producción de toxinas de *C. difficile* en caldos de cultivo. Además, la producción de toxinas se bloqueaba de manera eficaz en los cultivos en fase estacionaria. Como consecuencia de esta supresión de la producción de toxinas por los inhibidores de MetRS bacteriostáticos, *C. difficile* se vuelve básicamente no toxigénica y por lo tanto no patógena. Este efecto es exclusivo de los inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como los inhibidores de MetRS, cuyo modo de acción no requiere que las bacterias estén creciendo activamente.

#### Ejemplo 19: Compuestos de la presente invención: producción de esporas en *C. difficile*:

15 *C. difficile* es un organismo bien conocido por su capacidad de formar esporas que son resistentes al calentamiento, secado y a muchos agentes de limpieza tales como desinfectantes. Las esporas presentes en el ambiente pueden servir como depósito para organismos que causan enfermedades. Las infecciones por *C. difficile* se inician con frecuencia por la ingestión de esporas que germinan en el tracto GI provocando DACD. También se cree que la retención de esporas en el intestino después del tratamiento de la DACD es una fuente importante de recidiva de la enfermedad. La reducción de la capacidad de *C. difficile* para producir esporas o germinación de esporas podría representar un importante avance en el tratamiento de esta enfermedad. Las cubiertas de las esporas se componen principalmente de proteínas, la generación de la cubierta de la espora requiere la síntesis de proteínas y se espera que la inhibición de la síntesis activa de proteínas influya en la producción de esporas en este organismo. Por lo tanto, se evaluaron los inhibidores de MetRS para determinar su efecto sobre la producción de esporas de *C. difficile* *in vitro*.

#### Métodos:

25 Se evaluaron los inhibidores de MetRS para determinar su efecto sobre la esporulación de cuatro aislados clínicos de *C. difficile*, que incluían dos aislados recientes del brote que pertenece al genotipo BI/NAP1. Se cultivaron cepas de *C. difficile* en sangre de Brucella complementada durante 24 a 48 horas y las colonias se suspendieron en solución salina para alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland. Se diseminaron suspensiones de (10 µl) sobre la superficie de placas de agar de Brucella complementado recién preparado con sangre lacada de oveja al 5 % que contenía inhibidores de MetRS a concentraciones que variaban de 0,06 a 2 µg/ml y se incubaron anaeróticamente a 35 °C durante 96 horas. También se sembraron en placas alícuotas de las mismas suspensiones de células usadas para inocular las placas que contenían MetRS para recuentos viables y se trató un alícuota adicional de 250 µl con 250 µl de etanol absoluto durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las células vegetativas y permitir el recuento de esporas. Se determinó de nuevo la relación entre esporas y células totales para las cuatro cepas después de 96 horas de incubación en presencia de compuesto y se usó para comparar los efectos de los inhibidores de MetRS con los controles sin fármaco en las tasas de esporulación.

#### Resultados:

40 Tres de cada cuatro cepas de *C. difficile* producían un número mensurable de esporas y se evaluaron como se ha descrito anteriormente. El tratamiento de todas las cepas con 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona (Fórmula IX, Ejemplo 2; un compuesto relacionado con los compuestos de la invención tal como se reivindica) en todas las cepas mostró reducciones en la producción de esporas a 0,25 x CIM (< 2 % de esporas) y a 0,5 x CIM (< 1 % de esporas). Esto está en marcado contraste con los resultados obtenidos después del tratamiento con metronidazol, en el que todas las cepas sometidas a ensayo presentan notables aumentos en la producción de esporas (hasta un 100 % de esporas) después de la exposición a concentraciones subCIM del fármaco. El tratamiento con vancomicina inducía aumentos similares en la producción de esporas en dos cepas, pero no en una cepa en la que los recuentos de esporas permanecieron bajos.

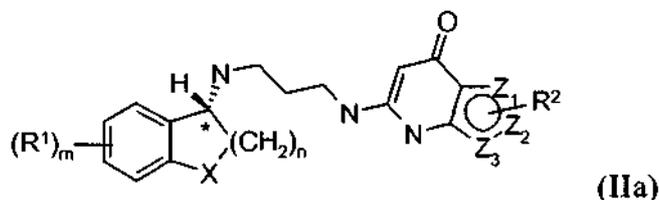
#### Conclusiones:

50 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona a subMIC (0,25 y 0,5 X CIM) era eficaz para evitar que las células vegetativas de *C. difficile* formasen esporas. Estos datos sugieren que la 5-[3-((R)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona también podría tener un papel útil en la prevención de brotes y en la reducción de las tasas de recidiva que se han correlacionado con la prevalencia generalizada de las esporas de *C. difficile* en el ambiente.

55 Mientras que la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a un número de realizaciones, los expertos en la materia entenderían que se pueden hacer cambios en la forma y en los detalles a las diversas realizaciones que se desvelan en el presente documento y que las diversas realizaciones que se desvelan en el presente documento no pretenden actuar como limitaciones en el alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

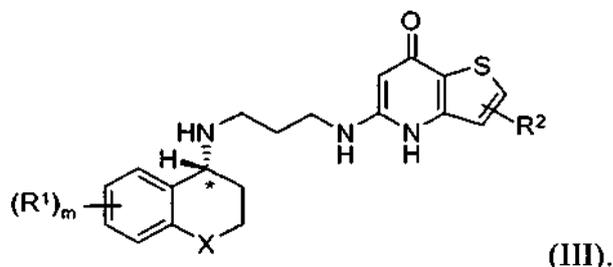
1. Un compuesto ópticamente activo de fórmula (IIa):



en la que:

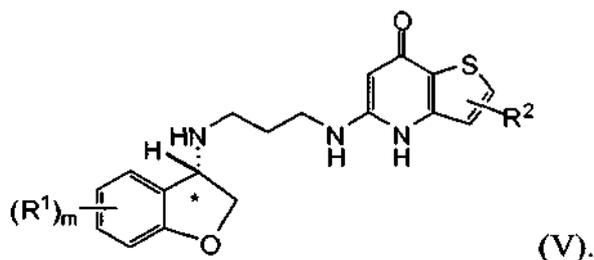
- 5 X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO, SO<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>;  
 n es 1, 2 o 3;  
 \* indica un átomo de carbono asimétrico, en el que cuando n es 2 o 3, entonces \* es la configuración R; en el que cuando n es 1 y X es CH<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración R; y en el que cuando n es 1 y X está seleccionado entre el grupo que consiste en NH, O, S, SO o SO<sub>2</sub>, entonces \* es la configuración S;  
 10 R<sup>1</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi, o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquiloxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo y heterocíclico;  
 15 m es 0, 1, 2, 3 o 4;  
 R<sup>2</sup> está seleccionado independientemente entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, amino, carboxi o alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>)), cicloalquilo (C<sub>3-7</sub>), alcoxi (C<sub>1-6</sub>), amino, mono- o dialquilamino (C<sub>1-6</sub>), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C<sub>1-6</sub>), carboxialquiloxi (C<sub>1-6</sub>), alquiltio (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfinilo (C<sub>1-6</sub>), alquilsulfonilo (C<sub>1-6</sub>), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C<sub>1-6</sub>), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo y heterocíclico; y  
 20 cuando Z<sub>1</sub> es S, Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> son CH; cuando Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>1</sub> y Z<sub>3</sub> son CH; y cuando Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> son CH.

2. Un compuesto ópticamente activo de la reivindicación 1 que tiene la fórmula (III):



3. El compuesto ópticamente activo de la reivindicación 2 en el que (R<sup>1</sup>)<sub>m</sub> es una sustitución en las posiciones 6, 8 y pueden ser los mismos o diferentes sustituyentes, en el que los sustituyentes están seleccionados entre el grupo que consiste en bromo, cloro, yodo y sulfano.

4. Un compuesto ópticamente activo de la reivindicación 1 que tiene una fórmula (V):



5. El compuesto ópticamente activo de la reivindicación 4 en el que (R<sup>1</sup>)<sub>m</sub> es una sustitución en las posiciones 5, 7 y pueden ser los mismos o diferentes sustituyentes, en el que los sustituyentes están seleccionados entre el grupo que consiste en bromo, cloro, yodo y sulfano.

6. Un compuesto ópticamente activo de la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 5-[3-((R)(-)-5,7-Dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-naftalen-1-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-*b*]piridin-7-ona;
  - 5-[3-((R)(+)-8-Bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-*b*]piridin-7-ona;
  - 5-[3-((R)(+)-6,8-Dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-*b*]piridin-7-ona;
  - 5-[3-((R)(+)-6,8-Dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-*b*]piridin-7-ona; y
  - 5-[3-((S)-5,7-Dibromo-2,3-dihidro-benzofuran-3-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-*b*]piridin-7-ona.
7. Una sal del compuesto de la reivindicación 1.
8. La sal de la reivindicación 7 en donde la sal es una sal farmacéuticamente aceptable.
9. Un compuesto según la reivindicación 1 para uso para el tratamiento de infecciones bacterianas.
- 10 10. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso para el tratamiento de una infección bacteriana en un ser humano.
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.
- 15 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para uso para el tratamiento de una infección bacteriana en un ser humano.